

525756

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/018616 A1

- (51) 国際特許分類: C12M 3/00  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010758  
(22) 国際出願日: 2003年8月26日 (26.08.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2002-245904 2002年8月26日 (26.08.2002) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).  
(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安田 賢二

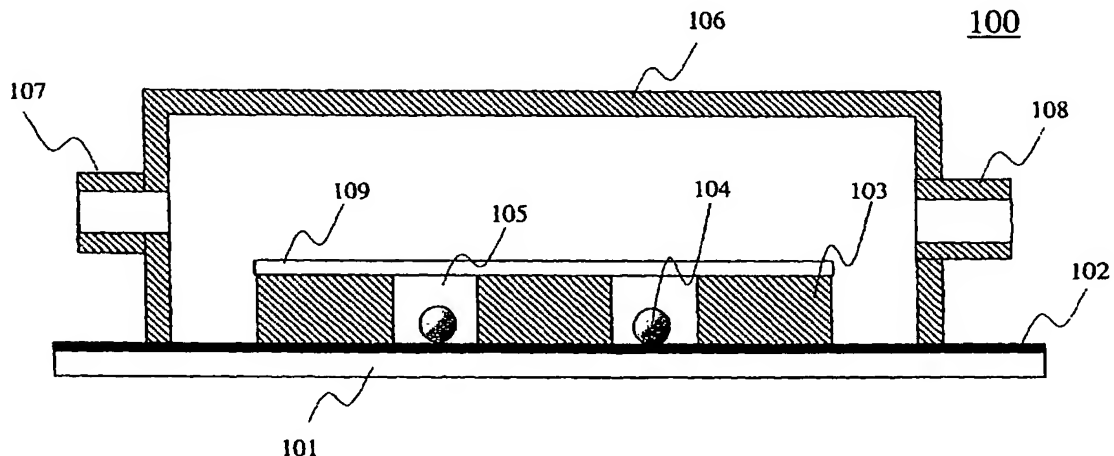
- (YASUDA, Kenji) [JP/JP]; 〒135-0052 東京都江東区潮見2-8-14-1014 Tokyo (JP). 一木 隆範 (ICHIKI, Takanori) [JP/JP]; 〒350-2203 埼玉県鶴ヶ島市上広谷343-5-302 Saitama (JP). 岡野 和宣 (OKANO, Kazunori) [JP/JP]; 〒353-0004 埼玉県志木市本町5-17-2-402 Saitama (JP).  
(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒107-0062 東京都港区南青山6丁目11番1号 スリーエフ南青山ビルディング7F Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (国内): CN, US.  
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: CELL-CULTIVATION MICROCHAMBER

(54) 発明の名称: 細胞培養マイクロチャンバー



(57) Abstract: A microchamber comprising a glass substrate (101) which is transparent to a specific wavelength, an absorbent region (102) which absorbs the specific wavelength, and a melting substance region (103) which does not absorb the specific wavelength, is solid at room temperature and melts when heated, which regions are layered on the glass substrate. The absorbent region, is irradiated with a focused light beam (402) of the specific wavelength and locally heated in the vicinity of the converging rays, so that the melting substance region (103) is locally melted at a portion adjacent to the absorbent region, thereby forming a cavity (403) as the focused light beam moves. Accordingly, the shape of the microchamber can be arbitrarily changed in accordance with the process of cellcultivation.

(57) 要約: 特定の波長に対して透明なガラス基板101上に、前記特定の波長に対して吸収を持つ領域102と、その吸収領域の他に、前記特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、常温では固体で加熱によって溶解する物質の領域103を積層し、特定の波長の集束光402をこの波長に対して吸収を持たず、かつ、加熱によって溶解する吸収領域に照射し、集束光近傍のみで局所的に発熱させ、その熱によって吸収領域に接して存在する溶解物質の領域103を局所的に溶解させ、集束光の移動に伴って空間403を形成し、培養の過程に応じてマイクロチャンバーの形状を任意に変化させることのできるマイクロチャンバーとする。

WO 2004/018616 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### 細胞培養マイクロチャンバー

#### 技術分野

この出願の発明は、細胞の状態を顕微鏡観察しながら、1細胞単位で培養することのできる、新しい細胞培養マイクロチャンバーに関するものである。

#### 背景技術

従来、細胞の状態の変化や、細胞の薬物等に対する応答を観察するのに、細胞集団の値の平均値をあたかも一細胞の特性であるかの様に観察してきた。しかし、実際には細胞は集団の中で細胞周期が同調しているものはまれであり、各々の細胞が異なった周期でタンパク質を発現している。これらの問題を解決するべく、同調培養等の手法が開発されているが、培養された細胞の由来が全く同一の一細胞からではないことから、培養前の由来細胞各々の遺伝子の違いがタンパク質発現の違いを生み出す可能性があり、実際に刺激に対する応答の結果を解析するときに、そのゆらぎが細胞の反応機構自体が普遍的に持つ応答のゆらぎに由来するものなのか、細胞の違い（すなわち遺伝情報の違い）に由来するゆらぎなのか明らかにすることは難しかった。また、同様の理由から、細胞株についても、一般には完全に一細胞から培養したものではないため、刺激に対する応答の再現性が細胞各々の遺伝子の違いによってゆらぐものか明らかにするのは難しかった。さらにまた、細胞に対する刺激（シグナル）は、細胞周辺の溶液に含まれるシグナル物質、栄養、溶存気体の量によって与えられるものと、他の細胞との物理的接触によるものの2種類があることから、ゆらぎについての判断が難しいのが実情であった。

一方、従来より、バイオテクノロジーの研究分野において細胞の観察を行う場合には、大型培養器にて培養された細胞群の一部を一時的に培養器から取り出して顕微鏡にセットし、観察を行うか、あるいは、顕微鏡全体をプラスチックの容器で囲い温度を管理し、その中に小さい別の容器を用い二酸化炭素濃度、及び湿度を管理しつつ、顕微鏡観察を行っていた。このとき、細胞を培養しながら、古くなった培養液と新鮮な培養液を交換することで溶液条件を一定にすることが工夫されてきている。たとえば特開平10-191961に開示されている方法では、循環ポンプが、基材表面に対する培地のレベルを基材の上端縁高さより高いレベルと下端縁高さより低いレベルとの間で上げ・下げ操作し、上記低レベルに下がると培地を供給し、上記高レベルに上がると培地を排出する機構によって栄養状態を一定に保っている。また、特許公開平8-172956では、培養容器内に、新たな培地を培養容器に導入する導入管と、培養容器の培地を外部に排出する排出管と、培養容器の気体部分とポンプとを連通する気管の各一端を挿入し、前記導入管、排出管及び気管の夫々の管路に培養容内への菌の侵入を阻止するフィルターを設けており、培養槽の栄養状態を一定に保つ構成になっている。しかし、いずれの発明の場合も、培養細胞の溶液環境と、細胞間の物理的接触を制御しながら培養する例は知られていない。

そこで、この出願の発明者らは、これらの問題点を解決し、新たに特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養する技術、および細胞を観察する場合に、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御する技術、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察する技術を発明し特願2000-356827として特許出願した。

しかしながら、発明者らによって新たに提案されたマイクロチャンバーは、それまでに知られていない構成の特徴のあるものであったが、ガラス微細加工技術等を用いてマイクロチャンバー形状を形成させるた

め、予め培養を開始する前にガラス表面に形状を作成し、その形状を利用して細胞を培養することができるものであった。そのため、各マイクロチャンパー間の相互作用を決める各マイクロチャンパー間を繋ぐ流路のパターンは培養後の状態に応じて柔軟に変化させることは難しかった。また、培養の経過に応じて各マイクロチャンパー自体の形状を変化させてゆくことも難しかった。

また、集束光等の熱を利用することで加熱、変形させる技術は、赤外光の波長より小さな三次元的局所領域での加熱が不可能であった。

そこで、この出願の発明は、発明者らによって開発された上記のマイクロチャンパーについてのさらなる詳細な検討を踏まえ、培養の過程に応じてマイクロチャンパーの形状を任意に変化させることのできる新しいマイクロチャンパーを提供することを課題とし、さらには、ナノレベルの微細な領域を局所的に加熱することのできる、新しい細胞培養マイクロチャンパーを提供することを課題としている。

#### 発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、特定の波長に対して透明な基板上に、前記特定の波長に対して吸収を持つ領域と、その吸収領域の他に、前記特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、水の沸点より低い温度の融点を持つ固体、たとえば常温では固体で加熱によって溶解する物質の領域によって構成される細胞培養マイクロチャンパーを提供し、また、このマイクロチャンパーを備えるとともに前記特定の波長の光照射の手段を有する細胞培養装置を提供する。

たとえば、具体的には、この出願の発明の細胞培養装置では、上記特定の波長の集束光を上記細胞培養マイクロチャンパーの特定の領域に照射する手段を有する。ここで、前記特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、固体の物質領域は、前記特定の波長の集束光が照射されることで吸収領域では局所的に発熱し、その熱によって吸収領域に接して存在す

る固体物質の領域が局所的に溶解して分散し、集束光の移動に伴って空間を形成する。

また、ナノレベルの微細な領域を局所的に加熱する手段を提供するためには、前記吸収を持つ吸収領域のパターンを微細描画によってナノレベルの微細な形状に形成し、このパターンに集束光を照射することで、薄膜層の線幅程度に限定された照射光の波長より小さな微小領域を局所的に加熱することができる。

さらに前記細胞培養マイクロチャンバー上面にはチャンバー内から細胞が出ないようにその上面を被覆する細胞が通過できない程度の目の粗い前記集束光に対して光学的に透明な半透膜と、その上面は培養液が循環する溶液交換部液交換を可能とする手段を有するものとすることもできる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、この出願の発明の基本構成の一例を示した模式図である。

図 2 は、図 1 で示した培養マイクロチャンバーの構成を示した模式図である。

図 3 は、図 1 で示した培養マイクロチャンバーを観察し集束光局所過熱する装置構成の一例を示した模式図である。

図 4 は、集束光局所過熱による培養マイクロチャンバー加工プロセスを説明する模式図である。

図 5 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図である。

図 6 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図である。

図 7 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図である。

図 8 は、集束光局所過熱による培養マイクロチャンバー加工プロセスの一例を説明した顕微鏡写真である。

図 9 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図である。

図 10 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図であ

る。

図 1 1 は、培養マイクロチャンバーの構成の一例を示した模式図である。

なお、図中の符号は次のものを示す。

- 1 0 0 細胞培養マイクロチャンバー
- 1 0 1 光学的に透明な基板
- 1 0 2、6 0 1、6 0 2、6 0 3 光学吸収を持つ薄膜層
- 1 0 3、5 0 1、5 0 2 光学的に透明で、かつ、低融点温度で細胞等  
に対して毒性を持たない物質の領域
- 1 0 4 細胞等の試料
- 1 0 5、8 0 1 穴
- 1 0 6 光学的に透明な容器
- 1 0 7、1 0 8 管
- 3 0 1 光源
- 3 0 2、3 0 9、3 1 2 フィルター
- 3 0 3 コンデンサレンズ
- 3 0 4 温調機能付ステージ
- 3 0 5 対物レンズ
- 3 0 6 可動ダイクロイック・ミラー
- 3 0 8 光源
- 3 1 0 ダイクロイック・ミラー
- 3 1 1 ミラー
- 3 1 3 カメラ
- 3 1 5 ステージ移動用モーター
- 3 1 6 培養液槽
- 3 1 7 供給装置
- 3 1 8 ポンプ
- 3 1 9 廃液溜

- 4 0 1 矢印
- 4 0 2 レーザー集束光
- 4 0 3、8 0 3、8 0 4、8 0 5、  
8 0 6、8 0 7、1 1 0 4 トンネル
- 7 0 1 吸光を持った微粒子
- 8 0 2 Nd : YAGレーザー集束光
- 9 1 1、1 0 1 1 丸い形状の穴
- 9 1 2 四角い形状の穴
- 1 0 1 2 星型の形状の穴
- 1 1 0 2 微細加工技術によって形成した吸光層のパターン

#### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

まず、この出願の発明の細胞培養マイクロチャンバーの基本構成の一例を図 1 の実施例を用いて説明する。たとえば図 1 に例示したように、この出願の発明の細胞培養マイクロチャンバー 1 0 0 では、スライドガラス等の光学的に透明な基板 1 0 1 上に、クロムの蒸着層などの光学吸収を持つ吸収層としての薄膜層 1 0 2 が配置されている。透過光で観察をする場合には、薄膜層 1 0 2 の膜厚は、光を完全に吸収しない程度で、かつ、むらの無い程度の薄いものであることが望ましい。たとえば、クロムの場合には、膜厚 5 0 Å で可視領域の透過光 7 0 % 程度である。次に、吸光薄膜層 1 0 2 の上に、アガロース等の光学的に透明で、かつ、低融点温度で、細胞等に対して毒性を持たない物質の領域 1 0 3 が積層されている。この領域 1 0 3 の物質は、この出願の発明において規定するところの、特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、水の沸点より低い温度の融点を持つ固体物質である。アガロースはその代表例であるが、一般的にはその融点が 4 5 °C 以下のものが望ましい。特にアガロースを



用いた場合には、細胞との接着性も無く、また、細胞に対してのシグナル物質でもないことから細胞にとっては無害なだけでなく、培養実験データへの影響が小さく最適であると考えられる。前記領域 103 においては、細胞 104 等の試料を導入する複数の穴 105 が、領域 103 を形成するときに鋳型によって形成されており、各穴 105 には、各々特定の細胞 104 が培養されている。このとき、たとえばクロムの蒸着層等の吸光薄膜層 102 表面にシラン化処理を施し、その上にコラーゲン等の細胞吸着性の因子を塗布固定して、上記細胞 104 が穴 105 の底面に安定して接着できるように加工を加えてもよい。また、この実施例のように領域 103 の上面にセルロース等の光学的に透明な半透膜 109 でカバーをすることで、外部からの微生物等のコンタミネーションを防ぎ、かつ、細胞が穴 105 から逃げるのを防ぐことも可能である。このとき、たとえば領域 103 がアガロース、半透膜 109 がセルロースであるとき、共に糖鎖の一部を開環させて、 $-CHO$  残基にアミノ末端を持つアビジン、ビオチンをそれぞれ修飾し、アビジン-ビオチン結合を通して、半透膜 109 と領域 103 を結合させてもよい。細胞 104 を培養するとき、培養液の循環が必要な場合には、領域 103 をすべて覆う形状の光学的に透明な容器 106 を被せて、管 107 から溶液を導入し、管 108 から廃液を回収すればよい。

図 2 は、領域 103、すなわち、アガロース等の光学的に透明で、かつ、低融点温度を有し、細胞等に対して毒性を持たない物質の領域に形成した穴 105 の配置の一例を示したものである。図からもわかるように、複数の穴 105 が領域 103 上に配置されており、ここに細胞を導入して培養することができる。

図 3 は、細胞培養マイクロチャンバー 100 の、前記の領域 103 の形状を加工するための集束光を導入するための装置の構成の一例を示したものである。この装置では、細胞等の試料を細胞培養マイクロチャンバ 100 で培養しながらその状態変化を観察するために、顕微鏡観察

系、培養液循環系を備え、そして細胞培養マイクロチャンバ100の形状を培養途中に加工変形させるために集束光照射系を有している。図3からもわかるように顕微観察光学系の光路上に培養マイクロチャンバ100を配置しており、この培養マイクロチャンバ100に溶液を供給する培養液供給・廃棄部がつながっている。すなわちまず、顕微観察光学系は、以下のような構成になっている。光源301から照射された光は、フィルター302で特定の波長に調整され、コンデンサレンズ303によって集光されて、培養マイクロチャンバ100に照射される。照射された光は、透過光として対物レンズ305での観察に用いられる。培養マイクロチャンバ100内部の透過光像は、ミラー311によってフィルタ312通過後、カメラ313に誘導され、カメラの受光面に結像する。従って、培養チャンバ100の素材は、フィルタ302で選択された波長の光に対して、光学的に透明な素材であることが望ましい。具体的には、ホウケイ酸ガラス、石英ガラス等のガラスや、ポリスチレン等の樹脂やプラスチック、あるいはシリコン基板等の固体基板および、アガロース等の高分子を用いる。また特にシリコン基板を用いる場合は波長900nm以上の波長の光を観測に用いることが考慮される。また、上記吸光層102のところで述べたように、光の吸収が100%未満となるような膜厚あるいは吸収を持たない波長を選択的に用いることが望ましい。

また、光源308から照射された光も、フィルター309で波長選択された後に、ダイクロイック・ミラー310によって対物レンズ305に誘導され、培養マイクロチャンバ100内部の蛍光観察の励起光として用いられる。培養マイクロチャンバ100から発した蛍光は再度対物レンズ305によって集光され、フィルター312によって励起光をカットした後の蛍光と透過光のみをカメラ313で観察することができる。このとき、フィルター302、309、312の組み合わせを調整することで、透過光のみをカメラ313で観察したり、あるいは蛍

光のみを観察したり、透過光像と蛍光像を同時に観察することもできる。

光路内には、レーザー光源 3 0 7 で発生させたレーザー光を可動ダイクロイック・ミラー 3 0 6 によって対物レンズ 3 0 5 に導入する機構も備わっている。このレーザーは対物レンズ 3 0 5 によって集束光となり、培養マイクロチャンバー 1 0 0 を局所的に加熱することができる。集光点を移動させる場合には、可動ダイクロイック・ミラーを移動させることで、培養マイクロチャンバー 1 0 0 内でのレーザーの集束位置を動かすことが可能である。このレーザーの波長としては、水の吸収を持たず、光化学作用を持たない波長が望ましい。たとえば Nd : YAG レーザーの 1 0 6 4 nm などでは、水、ガラス、アガロース等に対して顕著な吸収はなく、選択的にクロム薄膜層のみでレーザー光吸収が起こり、光が吸収されたクロム薄膜層の光集束点近傍のみで局所的に発熱する。この加熱によって、図 4 に沿って後段で詳しく説明するとおり、細胞培養マイクロチャンバー 1 0 0 の形状を培養途中において加工変形させることが可能とされる。

また、カメラで得られた画像データは画像処理解析装置 3 1 4 によって解析され、さまざまな解析結果を基に可動ダイクロイック・ミラー 3 0 6 や、培養マイクロチャンバー 1 0 0 が載っている温調機能付可動 X Y ステージ 3 0 4 の位置を制御するために X-Y 方向に自在に移動させるステージ移動用モーター 3 1 5 を駆動することができる。これによって細胞の形状を認識したり、認識後にその細胞を追跡し、つねに画像の中心に位置させたり、対物レンズとの距離を調節することで画像のピンポイントを特定の細胞に合わせたりすることが可能とされる。あるいは、一定時間の周期で可動ダイクロイック・ミラー 3 0 6 や、培養マイクロチャンバー 1 0 0 が載っている温調機能付ステージ 3 0 4 を制御したり、一定間隔でステージ移動用モーター 3 1 5 を駆動することができる。

次に、培養液供給・廃棄部を説明する。培養マイクロチャンバー 1 0 0 に複数の種類の種類、濃度の異なる培養液を培養液槽 3 1 6 から供給

する機能を有する供給装置 3 1 7 によって供給された培養液は、供給装置内の温度調節機構によって液温を調節され、さらに溶存空気交換機構によって溶存気体の成分が調整され、流速を調節されながら培養マイクロチャンバー 1 0 0 に供給される。容器 1 0 0 の培養液はまたポンプ 3 1 8 を用いて容器内部の溶液を吸引することができる。吸引した溶液は廃液溜 3 1 9 に送られる。

つぎに、図 4 を用いて、実際にレーザー集束光によって領域 1 0 3 の形状が変化する過程を説明する。対物レンズ 3 0 5 によって培養マイクロチャンバー 1 0 0 に照射されたレーザー集束光 4 0 2 は、選択的に吸光層 1 0 2 で吸収され、照射位置近傍で局所的に熱を発生する。このとき、その他の領域 1 0 1、1 0 3 ではレーザー集束光による吸収は無いため、直接の吸収による発熱は無いが、集光点での吸熱層 1 0 2 の局所発熱によって、近傍の領域 1 0 3 が局所的に溶解し、溶解した成分は培養液の水溶液中に拡散する。この状態で、集束光の位置を矢印 4 0 1 の方向に移動させると、領域 1 0 3 は選択的に吸光層 1 0 2 の近傍で溶解し、トンネル 4 0 3 を形成する。このとき、トンネルの径の大きさは、照射するレーザーの径、強度、移動速度に依存して変化させることができる。

図 5 は、培養マイクロチャンバーの別の基本構成の 1 つを示した実施例である。この実施例では図 1 の実施例で構成物が 1 つであった領域 1 0 3 を、融点の異なる 2 つの領域 5 0 1 と 5 0 2 からなるものとしている。これによって、たとえば、領域 5 0 1 の融点が領域 5 0 2 より低いものを用いた場合、集束光の加熱強度を適当に調節することによって領域 5 0 1 のみを選択的に排除することができる。また集束光強度を上げることによって、領域 5 0 1、5 0 2 をともに溶解することも可能である。この実施例では、異なる融点の領域を 2 相に積層しているが、さらに 3 層以上の異なる融点の素材を積層してもよい。また、三次元に領域分けをして、異なる融点の領域を配置してもよい。そして加熱集束光の

強度を調節することで、溶解領域を段階的に選択することが可能である。具体的には、たとえば異なる融点を持つ低融点アガロースを積層することで実現できるが、アガロースとプラスチックなど異なる素材を用いてもよい。

図6も培養マイクロチャンバーの別の基本構成の1つを示した実施例である。この実施例では、吸熱層601、602、603を領域103中の特定の高さの断層に配置している。そのため、この実施例の特徴は、集束光の加熱によって吸光層601、602、603が発熱した場合、この層を保持している領域103が、ともに溶解してしまうため、溶解と同時に吸光層が除去されることである。また、吸光・発熱によって作られるトンネルの高さは、領域103中の吸光層の位置に依存する。

図7の実施例も図6と同様、吸光層を領域103中に構成したものである。ただし、この実施例では吸光層ではなく、吸光を持った微粒子701を用いている。これによって、たとえば、領域103のある高さに層状に微粒子701を配置して特定の高度で層状に領域103を溶解したり、あるいは領域103全体に満遍なく微粒子701を分散させることで、領域103の集束レーザー光が照射された領域全体を溶解させることもできる。

図8は実際に集束光を用いて領域103を溶解させた結果の一例を示したものである。スライドガラス上に厚さ50nmのクロムを蒸着し、その上にコラーゲンを塗布した基板上に厚さ50μmのアガロースを積層し、アガロースが凝固する前に鋳型によって、50μm×50μmの鋳型を当てて穴801を形成した培養マイクロチャンバー81に、Nd:YAGレーザー集束光802を照射して移動させると基板82のように穴が掘られる。照射後には基板83のように直径5μm程度のトンネル803が形成される。同様な処理を行うことで、順次、基板84に見られるようにトンネル804を掘り、基板85のようにトンネル805を、基板86のようにトンネル806を掘ってゆくことができる。

そして更には、基板 8 7 に見られるように形成したトンネルを繋ぐトンネル 8 0 7 を形成することもできる。

図 9 および図 1 0 は、培養マイクロチャンバ 1 0 0 にトンネルを掘るだけでなく、培養マイクロチャンバの穴の形状を変えることが可能であることを示すための実施例である。図 9 では、丸い形状の穴 9 1 1 を四角い形状の穴 9 1 2 へと変化させることが可能であることを示している。また、図 1 0 では、丸い穴 1 0 1 1 を星型の形状 1 0 1 2 への変化させることが可能であることを示している。

図 1 1 は、微細加工技術によって集束光の波長より微小な吸光領域を形成することで、光の波長より小さな領域で局所的に発熱・溶解を可能にする実施例を説明した図である。微細加工技術によって形成した吸光層のパターン 1 1 0 2 の線幅がマイクロメートルより小さいとき、たとえば 1 0 6 4 nm の波長の集束レーザー光を照射すると、選択的に吸光領域のパターンでのみ光の吸収が起こり、光の波長より小さな領域のみで局所的に加熱することができ、トンネル 1 1 0 4 が形成される。これは、通常の集束光を用いた加熱のみでは光の波長程度までしか発熱源を集束できないことから、サブミクロン以下の形状のトンネル等を形成するには有効な手段である。同様に、サブミクロン以下の吸光微粒子を用いた場合にも同様な効果がある。

もちろん、この出願の発明は以上の例示説明に限定されるものではない。その細部についてさらに様々な形態が可能であることは言うまでもない。

#### 産業上の利用可能性

以上詳述したように、この出願の発明によって、従来不可能であった、生物細胞等を培養しつつ容器の形状をその培養過程に応じて変化させることが可能となる。また、光の波長以下の領域で局所的に物質を溶解させて、構造を形成することが可能となる。

## 請求の範囲

1. 特定の波長に対して吸収を持たない基板上に、前記特定の波長に対する吸収を持つ吸収層と、前記特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、水の沸点より低い温度に融点を持つ固体物質によって形成された領域とが配設されていることを特徴とする細胞培養マイクロチャンバー。
2. 吸収層は、基板表面に配置した薄膜であって、その上には前記の水の沸点より低い温度の融点を持つ物質によって形成された領域が配設されていることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。
3. 吸収層としての薄膜は、可視光について透過率50%以上となる厚さであることを特徴とする請求項2の細胞培養マイクロチャンバー。
4. 吸収層は、基板表面に配置した薄膜パターンであって、その線幅は前記特定の波長より細いことを特徴とする請求項1ないし3のいずれかの細胞培養マイクロチャンバー。
5. 吸収層は、前記特定の波長に対する吸収を持つ微粒子であって、これらが前記水の沸点より低い温度に融点を持つ物質中に配置されていることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。
6. 水の沸点より低い温度に融点を持つ固体物質は、その融点が45度以下の物質であることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。
7. 水の沸点より低い温度に融点を持つ固体物質は、アガロースであることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。
8. 水の沸点より低い温度に融点を持つ固体物質として2つ以上の異なる融点の物質が組み合わせて配置されていることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。
9. 特定の波長は、水の吸収の無い波長であることを特徴とする請求項1の細胞培養マイクロチャンバー。

10. 請求項1ないし9のいずれかの細胞培養マイクロチャンバーを備えた細胞培養装置であって、前記特定の波長に対して吸収を持たず、かつ、水の沸点より低い温度の融点を持つ固体物質によって形成された領域を加熱溶解して空間を形成することのできる前記特定の波長の光照射の手段を有していることを特徴とする細胞培養装置。

11. 光照射の手段は集束光を照射するものであることを特徴とする請求項10の細胞培養装置。



図 1

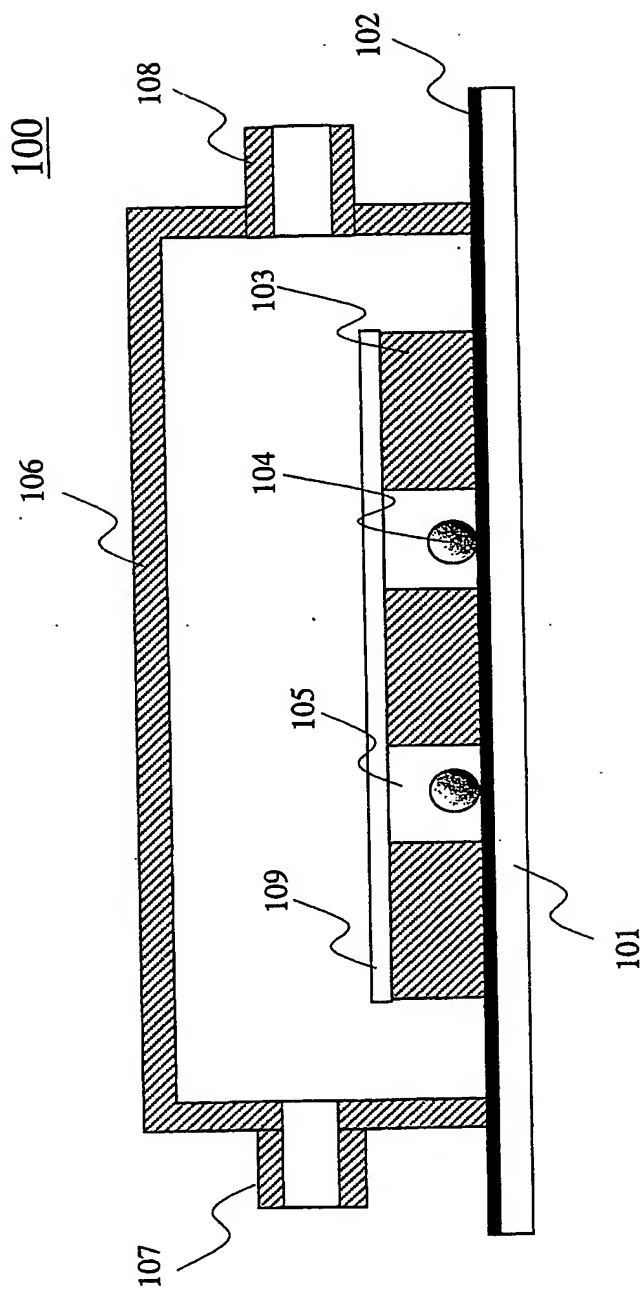


図 2

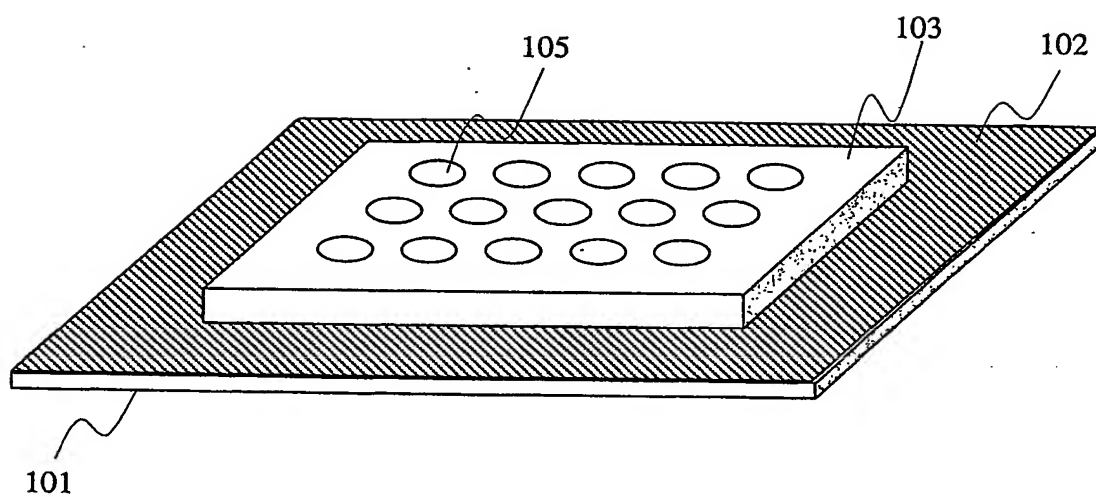


図 3

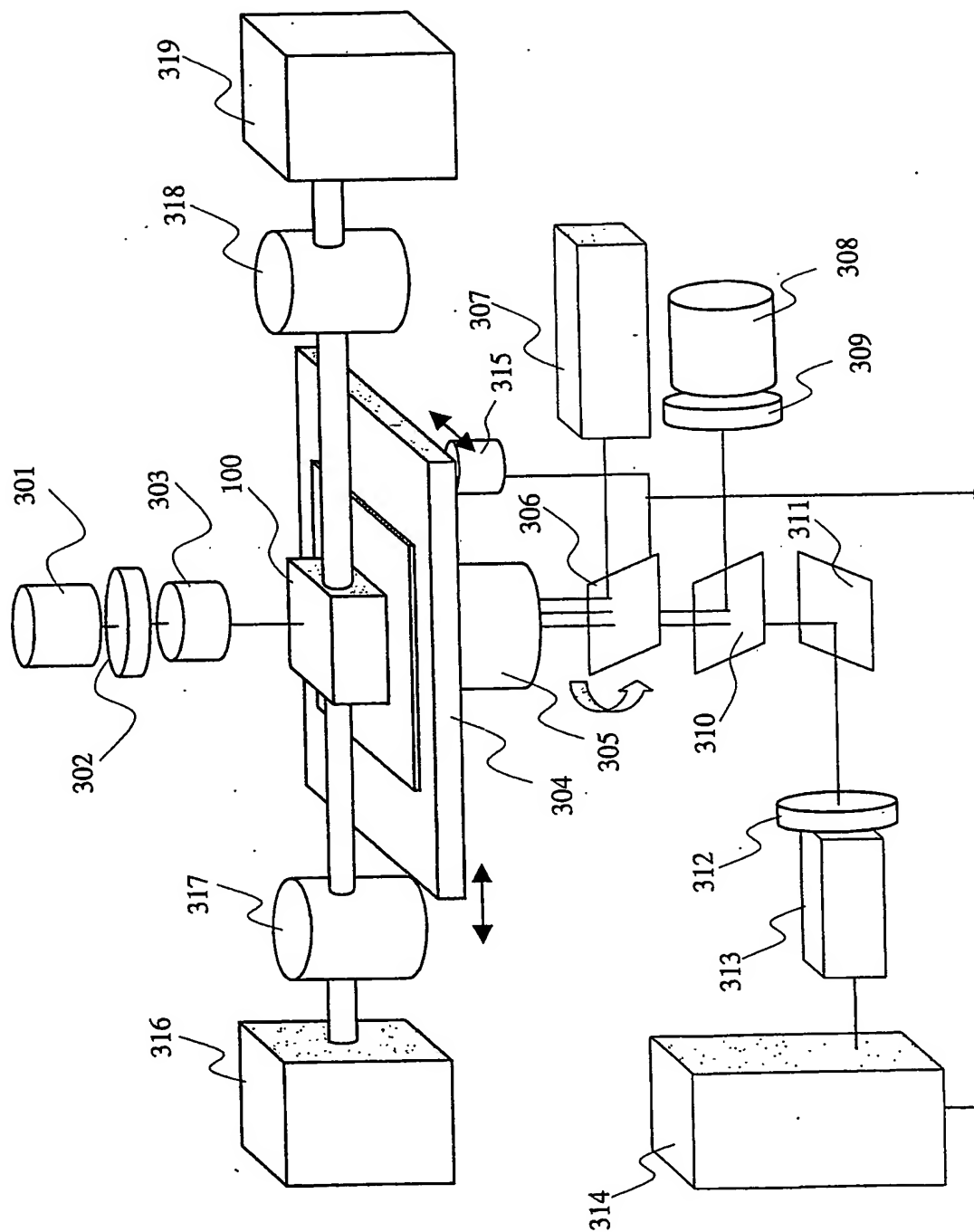


図 4

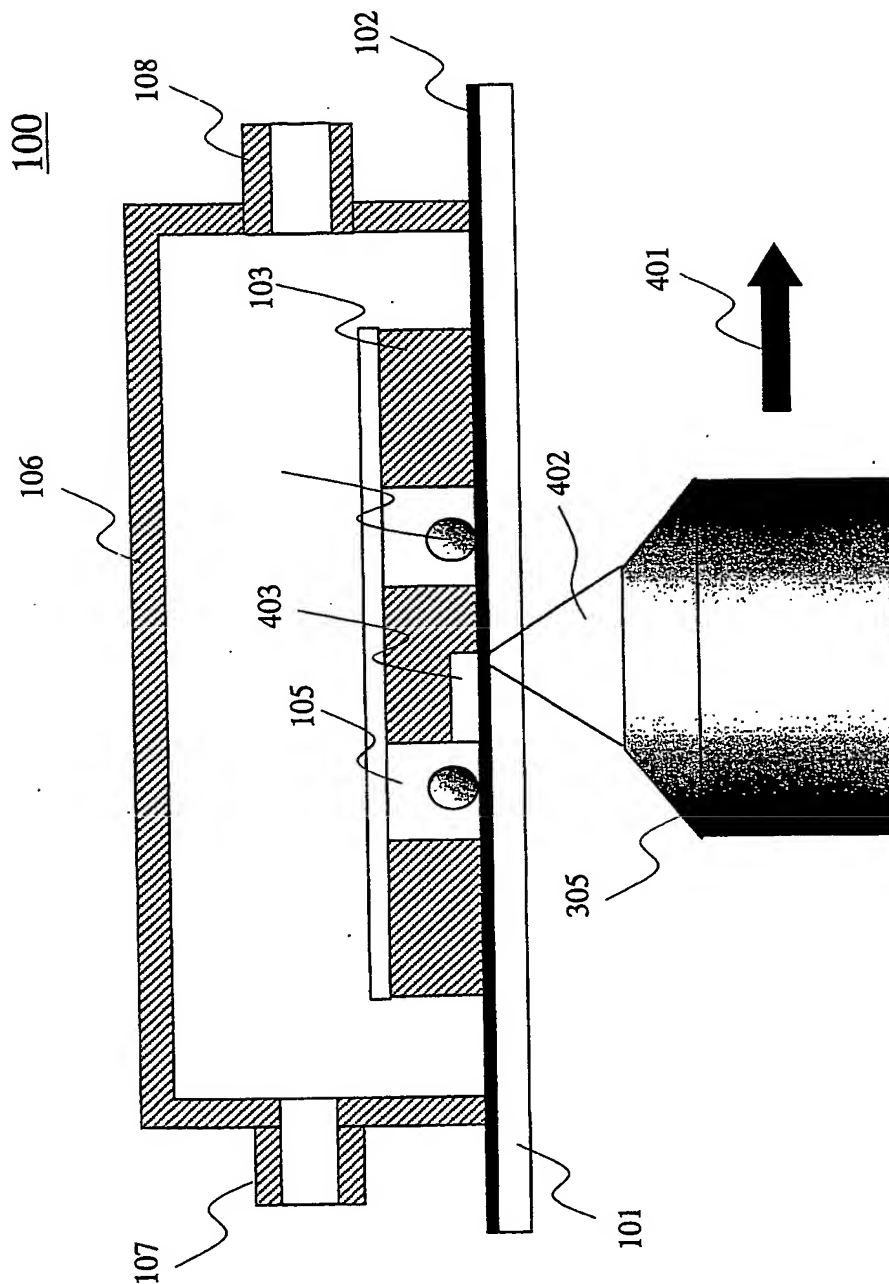


図 5

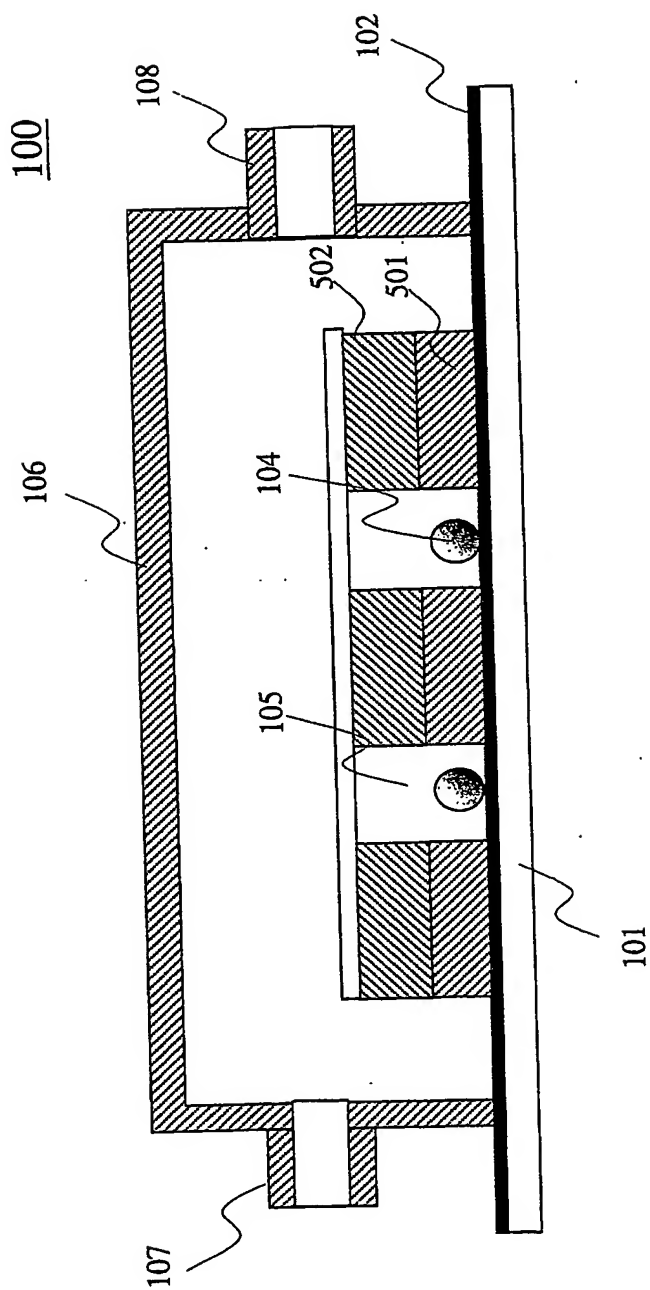


図 6

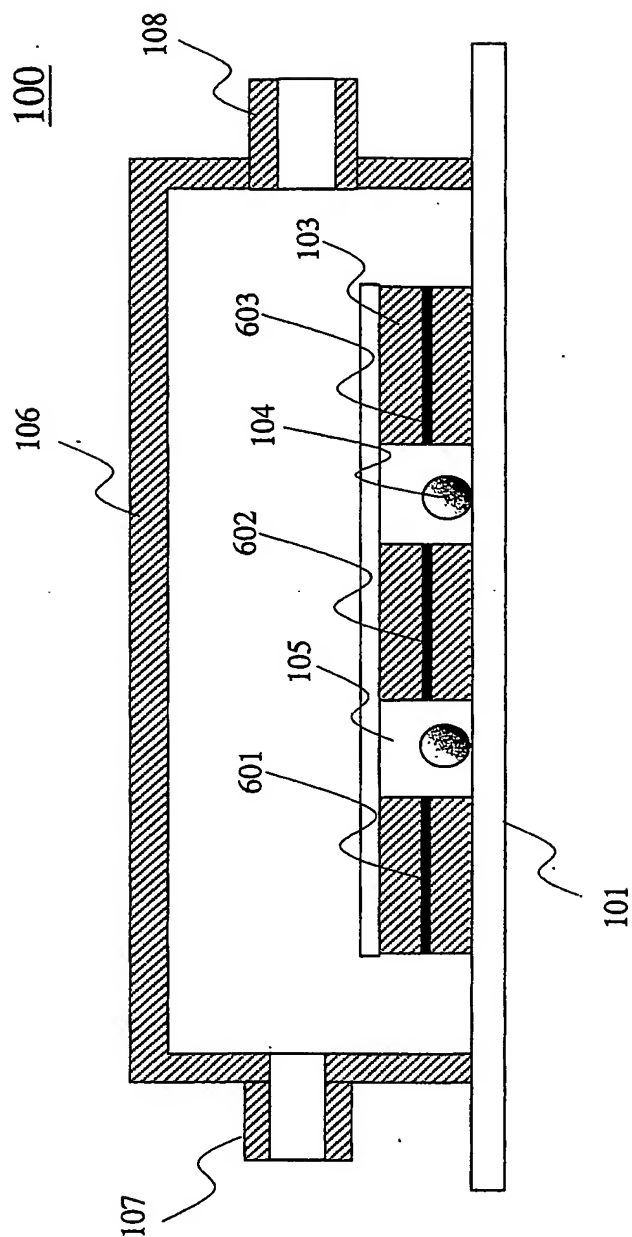


図 7

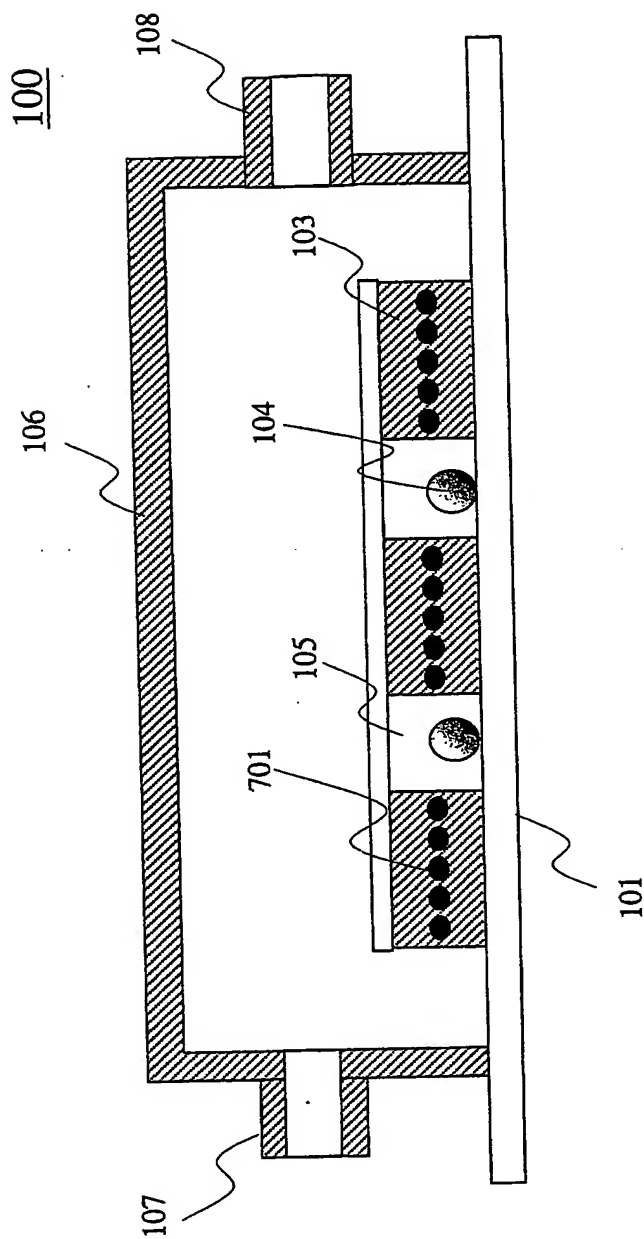
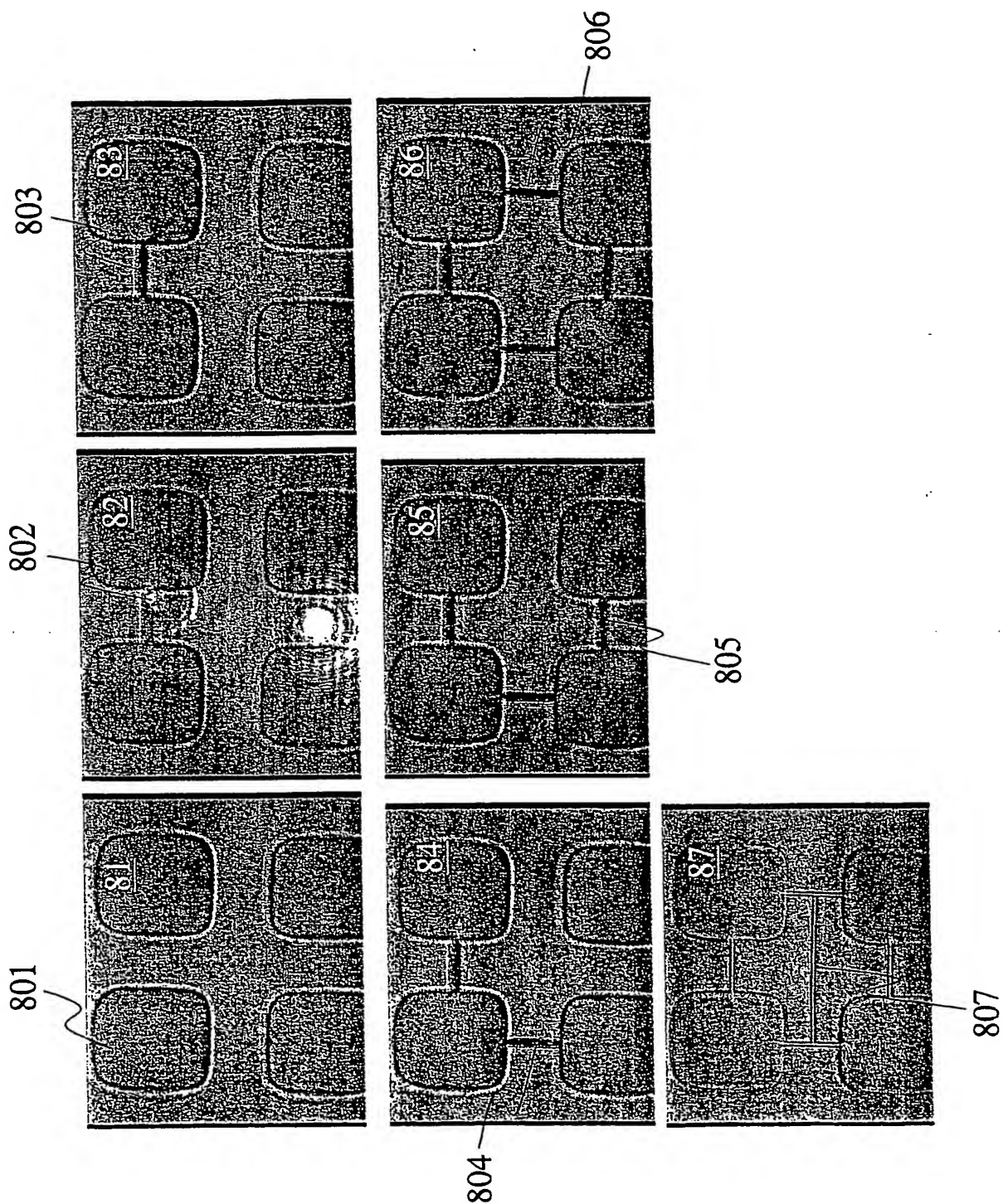


図 8



8/11

差替え用紙(規則26)



図 9

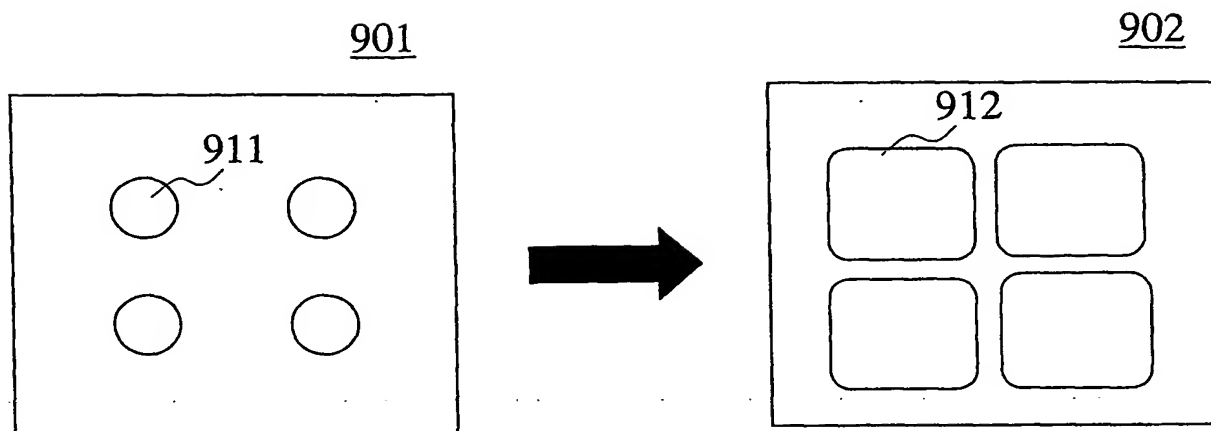


図 10

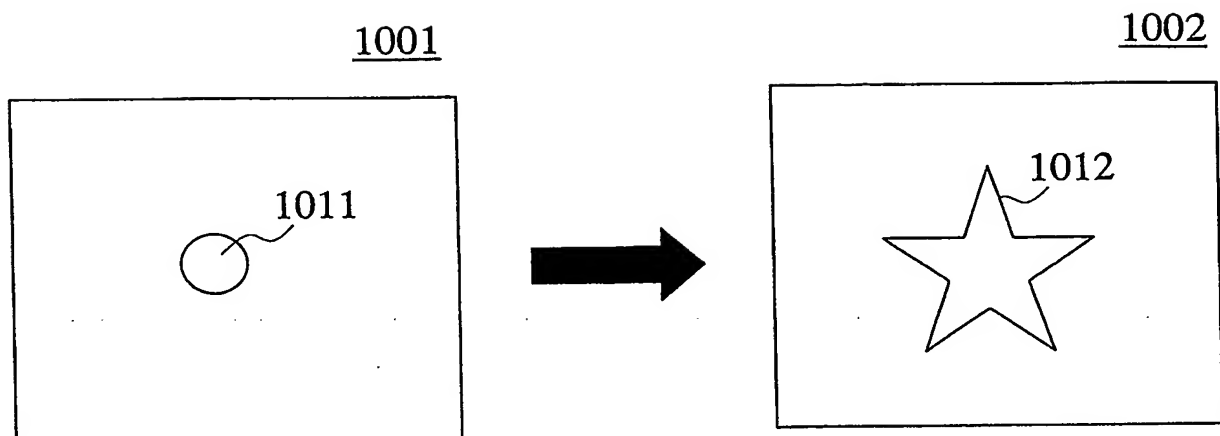
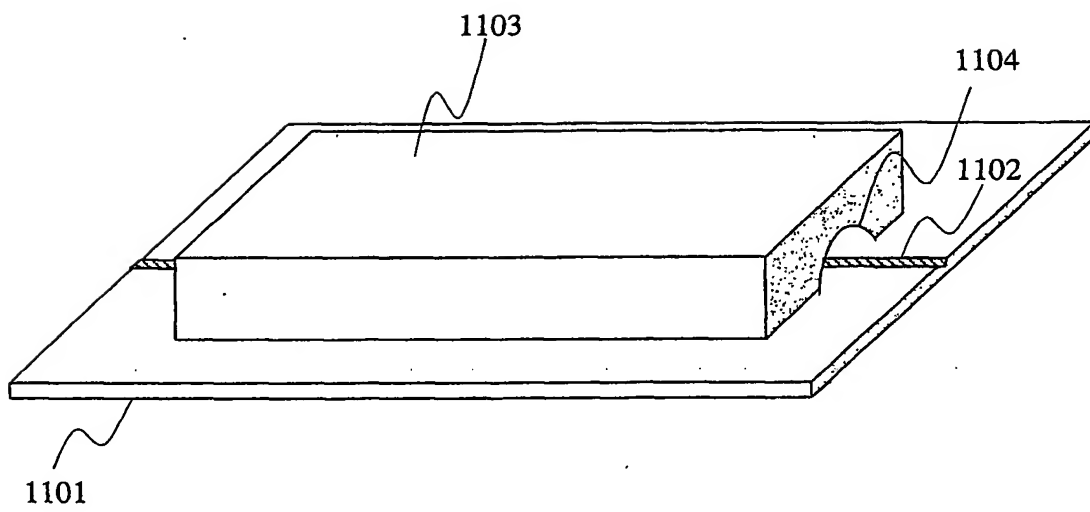


図 11



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/10758

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-17155 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 23 January, 2001 (23.01.01), (Family: none)	1,6-9
A	WO 02/42411 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 30 May, 2002 (30.05.02), & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-11
A	JP 10-191961 A (Meiitsu Ryo), 28 July, 1998 (28.07.98), & DE 19725602 A1	1-11
A	JP 8-172956 A (Tokimec Inc.), 09 July, 1996 (09.07.96), (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 October, 2003 (22.10.03)

Date of mailing of the international search report  
04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12M1/00-3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-17155 A (住友ベークライト株式会社) 2001.01.23 (ファミリーなし)	1, 6-9
A	WO 02/42411 A1 (科学技術振興事業団) 2002.05.30 & EP 1344817 A1 & JP 2002-153260 A	1-11
A	JP 10-191961 A (廖 明一) 1998.07.28 & DE 19725602 A1	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.10.03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 8-172956 A (株式会社トキメック) 1996. 07. 09 (ファミリーなし)	1-11